Medizinische Klinik und Poliklinik E
der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. H. Zimmermann)

Pharmakokinetik subkutan injizierten Insulins: Untersuchungen zur Absorption von freien Insulinmischungen Actrapid®-Monotard® und Velasulin®-Insulatard® im Vergleich zur fixen Mischung Mixtard®

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Wolfgang Caspari

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536502_0052

Medizinische Klinik und Poliklinik E
der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. H. Zimmermann)

Pharmakokinetik subkutan injizierten Insulins: Untersuchungen zur Absorption von freien Insulinmischungen Actrapid®-Monotard® und Velasulin®-Insulatard® im Vergleich zur fixen Mischung Mixtard®

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Wolfgang Caspari

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. A. Hopf

Referent
gez.: Priv. Doz. Dr. H.-J. Cüppers

Korreferent
gez.: Prof. Dr. B. Grabensee

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit	2
1.2	Chemische Struktur des Insulins und historischer Überblick	2
1.3	Pharmazeutische Zubereitung und klinische Wirkung	3
2.	Methoden und Experimente	8
2.1	Versuchsplan	8
2.2	Analytische Methoden	9
2.3	Versuchsdurchführung	9
2.4	Statistische und pharmakokinetische Berechnungen	10
3.	Ergebnisse	12
3.1	Actrapid^{R}/Monotard^{R}	12
3.2	Velasulin^{R}/Insulatard^{R}	13
3.3	Mixtard^{R}	14
4.	Diskussion	18
5.	Zusammenfassung	22
6.	Literaturverzeichnis	23

Lebenslauf

1. Einleitung

Das Ziel der Behandlung des Patienten mit juvenilem Diabetes Mellitus ist die Einstellung einer möglichst konstanten, normalen Stoffwechsellage. Darunter ist nicht nur die Senkung des Blutzuckers zu verstehen, sondern auch eine Normalisierung des Protein- und Lipidstoffwechsels. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, weil ein kausaler Zusammenhang zwischen der diabetischen Stoffwechselentgleisung und den Spätfolgen wie den Angiopathien (Brownlee & Cahill 1979), Neuropathien und Retinopathien nachgewiesen werden konnte. Um eine optimale Stoffwechseleinstellung zu erreichen, ist es nötig, den Patienten in Bezug auf Diätvorschriften, Selbstkontrolle der Blutzuckereinstellung und Insulintherapie ausreichend zu schulen (Jörgens 1979). Hierzu gehört auch die Aufklärung des Patienten über verschiedene Faktoren, die die Absorption des Insulins aus dem subcutanen Injektionsdepot beeinflussen können. So wurden z.B. signifikant höhere Absorptionsdosen gemessen, wenn das Insulin statt in den Oberschenkel im Bereich des Abdomens oder in den Oberarm injiziert wurde. Auch die Erwärmung oder Massage der Injektionsstelle erhöhte die Absorptionsrate, wohingegen eine Abkühlung der Injektionsstelle ein Absinken der Bioverfügbarkeit des Insulins zur Folge hatte (Cüppers 1980).

Ebenso wichtig für die Erzielung einer ausgeglichenen Stoffwechsellage ist die Wahl eines den Lebensgewohnheiten des Patienten adäquaten Insulinpräparates und seine individuelle Dosierung. Zur Auswahl stehen heute kurz- (bzw. Alt-) und langwirkende Insuline. Die Altinsuline besitzen eine kurze Wirkzeit, die mehrfache Injektionen pro Tag erforderlich macht. Die Verzögerungsinsuline verfügen dagegen über eine verlänger-

te Wirkdauer, die jedoch mit einem spät einsetzenden Initialeffekt gekoppelt ist. Deshalb geht man heute dazu über, ein kurzwirkendes mit einem langwirkenden Insulin zu kombinieren.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Therapie mit Kombinationen von kurz- und langwirkenden Insulinen können die beiden Insuline kurz vor der Injektion gemischt werden. Bei diesen sogenannten freien Mischungen kann das Verhältnis von Alt- zu Verzögerungsinsulin nach Bedarf variiert werden, um so eine für den einzelnen Patienten optimale Mischung zu erreichen. Für Patienten, die nicht in der Lage sind, die Insuline selber zu mischen, stehen auch kommerzielle, fertige Mischungen zur Verfügung. Als Beispiele seien hier das Insulin Mixtard^{R} und das Insulin Novo Rapitard^{R} genannt. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob bei freien Mischungen von Insulinen mit der gleichen Pharmakokinetik gerechnet werden kann, wie bei einer kommerziellen Mischung.

1.2 Chemische Struktur des Insulins und historischer Überblick

Insulin (MG 6000) ist ein Proteohormon, das in den ß-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildet wird. Es besteht aus 2 Peptidketten (eine A-Kette mit 21 Aminosäuren und eine B-Kette mit 30 Aminosäuren), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Biosynthese erfolgt über das Proinsulin, das aus einer einzigen Peptidkette mit 81 Aminosäuren besteht. Aus dieser Vorstufe wird enzymatisch ein Mit-

telstück, das sogenannte C-Peptid, herausgelöst.

Das erste therapeutisch verwendbare Insulin wurde 1921 von Banting und Best isoliert. Zuerst lag Insulin nur als klare, saure Lösung mit kurzer Wirkzeit vor. Um den Patienten die Unbequemlichkeiten mehrmaliger Injektionen pro Tag zu ersparen, suchte man in den nachfolgenden Jahren nach einer Möglichkeit, die Wirkzeit des Insulins zu verlängern. Dies gelang erst 1936, als Hagedorn die absorptionsverzögernde Wirkung des Protamins erkannte. Im gleichen Jahr entdeckten Scott und Fisher, daß Insulin mit Hilfe von Zinkionen kristallisiert, und auch auf diese Weise eine Resorptionsverzögerung herbeigeführt wird.

1.3 Pharmazeutische Zubereitung und klinische Wirkung

Insulin wird in verschiedenen pharmazeutischen Zubereitungen angeboten, die durch Wirkungseintritt, Wirkungsmaximum und Wirkungsdauer charakterisiert werden können.

Altinsuline

Die ersten Insuline lagen in Form von sauren, isotonen Lösungen vor. Inzwischen wurden Altinsuline entwickelt, die als neutrale Lösungen vorliegen. Als Konservierungssubstanzen werden Nipaginester, Phenol und m-Kresol verwendet. Der neutrale Ph wird mit Hilfe eines Phosphat- oder Acetatpuffers eingestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Altinsuline Velasulin^{R} und Actrapid^{R} sind neutrale Lösungen aus Schweineinsulin. Die einzelnen Konservierungszusätze und Puffer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Bezeichnung	Spezies	Reinheit	pH	Puffersubstanz	Konservierungsmittel
Insulin Hoechst^{R}	Rind	K	3	keine	Nip
Insulin S Hoechst^{R}	Schwein	C	3	keine	Nip
Velasulin^{R}	Schwein	K	7	Phosphat	m-Kresol
MC-Insulin Novo-Actrapid^{R}	Schwein	MC	7	Acetat	Nip

Abb. 1: Auswahl verschiedener handelsüblicher Altinsulinpräparate, K = Kristallisation; C = Gelfiltrationschromatographie: MC = Monokomponent; Nip = Nipaginester (Methyl-, Äthyl- oder Propyl-p-Hydroxybenzoat).

Der Wirkungseintritt der Altinsuline liegt ca. 15 Minuten post injectionem. Die Wirkdauer beträgt bis zu 6 Stunden und das Wirkmaximum wird nach ca. 1,5 Stunden erreicht. Die sauren Insuline besitzen einen etwas verzögerten Wirkungsablauf gegenüber den neutralen Altinsulinen, da das saure Insulin nach der subcutanen Injektion teilweise an seinem isoelektrischen Punkt (pH = 5,2) ausflockt und erst bei weiterer Angleichung an den neutralen bis alkalischen pH des Gewebes wieder in Lösung geht.

Verzögerungsinsuline

Die gegenüber den Altinsulinen verlängerte Wirkung der Verzögerungsinsuline wird durch Verwendung von Substanzen erreicht, die selbst nicht blutzuckersenkend wirken, jedoch die Resorption des Insulins aus dem subcutanen Injektionsdepot verzögern. An dieser Stelle soll nur auf die für diese Arbeit relevanten Verzögerungssubstanzen eingegangen werden.

a) Protamin

Protamin ist ein alkalisches Polypeptid, das hauptsächlich aus der Aminosäure Arginin besteht. Es wird aus Fischsperma gewonnen. Das Protamin bildet mit Insulin einen Komplex, indem sich die Carboxylgruppen des Insulins mit den Aminogruppen des Protamins verbinden. Diese Bindungen können durch fibrinolytische Enzyme wieder gelöst werden. Als Beispiel sei hier das Insulin Insulatard^{R} (NPH) genannt, eine neutrale Suspension aus kristallinen Insulin-Protamin-Komplexen im isophanen Mischungsverhältnis. Die Kristalle besitzen eine tetragonale Form. Der Protamingehalt beträgt 0,3 mg/100 Units bei einem Zinkgehalt von 0,016 - 0,04 mg. Dies entspricht einem stöchiometrischen Verhältnis des Zinks zum Insulin von 2:6.

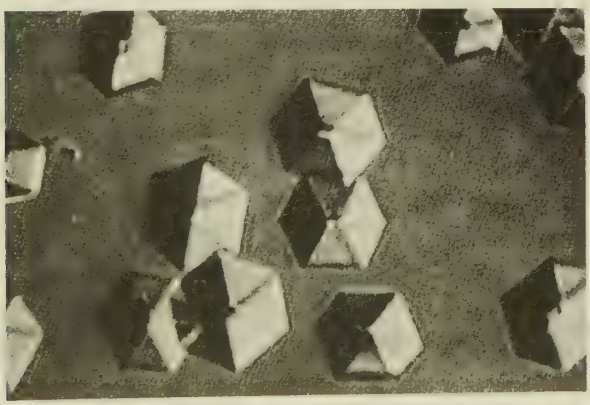

Abb. 2: Protamin-Insulin-Kristalle

UNIV. [illegible] KIEL

Die Stabilität des neutralen pH wird durch Zusatz eines Phosphatpuffers gewährleistet. Erhöht man in einem solchen Insulin den Zinkgehalt bis auf 0,2 mg/100 Units, so erhält man Zink-Insulin-Protaminat-Kristalle. Aus diesen Kristallen wird Insulin noch langsamer freigesetzt als aus den einfachen Insulin-Protamin-Komplexen.

b) Zink

Wird statt des Phosphatpuffers ein Puffer mit einem für das Zink indifferenten Anion wie z.B. Acetat verwendet, so bilden sich Zink-Insulin-Kristalle, die Retardierungseffekte zeigen, welche von der physikalischen Zustandsform der Kristalle abhängig sind. Je größer die Kristalle sind, umso ausgeprägter ist die Resorptionsverzögerung. Die Zinkionen sind dabei strukturgebende Elemente. Man findet die Kristalle aus Einheitszellen aufgebaut, die aus je drei mal zwei Insulinmolekülen mit zwei Zinkatomen im Inneren des Hexamers bestehen. Die Form dieser Kristalle ist rhomboedrisch. Zu ihrer Ausbildung sind auch Anionen wie Acetat, Citrat, Phosphat, Carbonat und Chlorid erforderlich (Hallas-Møller 1951).
Die Metallaufnahme des Insulins ist pH-abhängig (Schlichtkrull 1975). Eine Zinkaufnahme erfolgt oberhalb pH 4 und erhöht sich bei steigendem pH. Als Beispiel für ein Verzögerungsinsulin dieser Art sei das Insulin Monotard^{R} (Novo) genannt. In dieser Präperation befinden sich sowohl amorphe als auch kristalline Insulin-Zink-Komplexe. Der Zinkgehalt beträgt 0,2 - 0,25 mg/100 Units. Durch die unterschiedliche Größe der Insulin-Zink-Komplexe soll eine kontinuierliche Insulinfreisetzung gewährleistet werden.

Die Wirkdauer der Verzögerungsinsuline liegt in der Regel zwischen 12 und 16 Stunden. Ein Initialeffekt ist nach 1 bis 2 Stunden und ein Maximaleffekt nach 4 bis 8 Stunden zu erwarten. Die Zusätze der einzelnen Präperationen können aus Abbildung 3 ersehen werden.

name	purity		retarding substances
	recryst	highly purified	mg/100 Units
NPH	+	+	0,3-0,6 mg protamine
Depot	+	-	0,6 mg protamine + 0,15 mg Zn
Semilente^{R}	+	+	0,2-0,25 mg Zn
Lente^{R}	+	-	0,2-0,25 mg Zn
Monotard^{R}	-	+	0,2-0,25 mg Zn
Depot	+	+	0,4 mg Surfen
KOMB^{R}	+	-	0,28 mg Surfen

Abb. 3: Auswahl verschiedener handelsüblicher Intermediärinsuline

Mischungen von Insulinen

Es handelt sich um Mischungen von kurz- und langwirkenden Insulinen. Bei diesen Mischungen sollen die Vorteile der verschiedenen Insulinzubereitungen kombiniert werden. So erhofft man sich einen frühen Initialeffekt bei erhaltener Depotwirkung. Bei diesen Mischungen ist auf die Verträglichkeit der verschiedenen pharmazeutischen Zubereitungen zu achten. So lassen sich Insuline mit unterschiedlichem pH nicht mischen, da eine Änderung des pH eine schwerwiegende Änderung der Resorptionskinetik des Insulins zur Folge haben könnte

(Schlichtkrull 1975). Zudem muß beachtet werden, daß nicht ein Überschuß an Protamin oder Zink im Verzögerungsinsulin einen Übergang des Altinsulins in die Depotform verursacht (Kasemir & Kerp 1980).

Bei freien Mischungen von Insulinen, die direkt nach dem Mischen injiziert werden, wurden bereits Untersuchungen über die Absorptionskinetik veröffentlicht (Cüppers 1980). Für die kommerziellen Mischungen fehlen bisher genauere derartige Untersuchungen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Insulin Mixtard^{R} (Nordisk) ist eine fertige Mischung aus 30 Teilen Velasulin^{R} und 70 Teilen Insulatard^{R}.

2. Methoden und Experimente

2.1 Versuchsplan

Als Versuchspersonen wurden 5 normgewichtige männliche Personen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren ausgewählt. Zur Zeit der Untersuchung war bei den Probanden anamnestisch keine Krankheit bekannt. Sie waren frei von akuten oder chronischen Infekten und nahmen keine Medikamente ein. Die Probanden erschienen morgens nach 12-stündiger Nahrungskarenz zu den Versuchen. Während der Versuche ruhten sie bei Raumtemperatur in liegender Position.
Die Insulininjektionen erfolgten subkutan in den Oberschenkel, wobei streng auf gleichbleibende Injektionstechnik geachtet wurde. Nach den Versuchen erhielten die Probanden eine kohlenhydratreiche Mahlzeit, um mögliche Hypoglykamien zu vermeiden.
Die Blutentnahme erfolgte über eine Braunüle aus einer

Cubitalvene. Während des Versuchs wurde die Braunüle durch Infusion einer 0,9 % NaCl Lösung offengehalten.

Die Blutabnahmen erfolgten zu den Zeiten:
-15, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 und 180 Minuten.
Die Insulininjektion erfolgte bei 0 Minuten.
Folgende Blutparameter wurden untersucht:

- Glukose -
- Insulin -.

2.2 Analytische Methoden

Die Blutglukose wurde mit dem Beckmann Glukose-Analyzer bestimmt.
Als Maß für die Absorption des Insulins aus dem subkutanen Injektionsdepot diente die Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum -IRI-, die mit Hilfe spezifischer Radioimmunassays (Wide und Porath 1966) gemessen wurde. Wegen der kurzen Halbwertszeit (ca. 5 min.) des Insulins und dem Sistieren der körpereigenen Insulinproduktion durch den raschen Blutzuckerabfall nach Applikation exogenen Insulins (Berger et al 1982) eignet sich die direkte Meßmethode besonders für die Untersuchung der Absorptionskinetik subkutan injizierten Insulins.

2.3 Versuchsdurchführung

Die Probanden erhielten an drei verschiedenen Tagen in randomisierter Reihenfolge jeweils 20 Einheiten Insulin injiziert. Dabei wurden die Insuline wie folgt kombiniert:

2.3.1: 6 E Actrapid^{R} und 14 E Monotard^{R} gemischt und sofort injiziert.

2.3.2: 6 E Velasulin^{R} und 14 E Insulatard^{R} gemischt und sofort injiziert.

2.3.3: 20 E Mixtard^{R} injiziert.

2.4 Statistische und pharmakokinetische Berechnungen

Folgende statistische Parameter wurden zur Auswertung genutzt:

a) Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{x_i}{n}$$

n: Anzahl der Messungen

b) Standardabweichung (SD):

$$s_x = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

c) Mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM):

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_x^2}{n}}$$

d) Der Unterschied zwischen den Mittelwerten wurde mit dem t-Test nach Student für gepaarte Stichproben auf Signifikanz geprüft.

$$t_{n-1} = \frac{\bar{d}}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

wobei $\bar{d}$ dem Mittelwert der Differenzen oder der Differenz der Mittelwerte entspricht. s_d ist die Standardabweichung der Differenzen.
$p < 0,05$ wurde entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % als signifikant angenommen.

e) Berechnung von $[IRI]_{max}$ und $T_{[IRI]_{max}}$

Aus den höchsten Seruminsulinkonzentrationen der einzelnen Probanden einer Untersuchungsgruppe wurde die maximale Hormonkonzentration $[IRI]_{max}$ in µU/ml errechnet. Der Zeitpunkt, zu dem die maximale Insulinkonzentration erreicht wurde, wird als $T_{[IRI]_{max}}$ in Minuten der jeweiligen Untersuchungsgruppe bezeichnet. Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM.

f) Berechnung der Fläche unter der Insulin-Konzentrations-Zeitkurve

Die Fläche unter der Insulinkurve (AUC = Area under curve) wurde berechnet unter Auflösung des Flächenintegrals nach der Trapezoidregel (Klotz 1979) und Aufsummation der trapezförmigen Segmente nach:

$$Cdt = AUC = \frac{1}{2} (y_{n-1} + y_n) (x_n - x_{n-1})$$

mit y = Konzentration am jeweiligen Meßpunkt
und x = Zeit am jeweiligen Meßpunkt.

3. Ergebnisse

3.1 Actrapid^{R}/Monotard^{R}

Ausgehend von einer Seruminsulinkonzentration von 7,3 µU/ml bei -15 Minuten steigt die Insulinkonzentration nach der Injektion von 6 E Actrapid^{R} und 14 E Monotard^{R} auf eine maximale Konzentration von 16,8 $\pm$ 1,2 µU/ml ($[IRI]_{max}$) an. Dieser Wert wird nach 79 $\pm$ 8 Minuten ($T_{[IRI]max}$) erreicht.

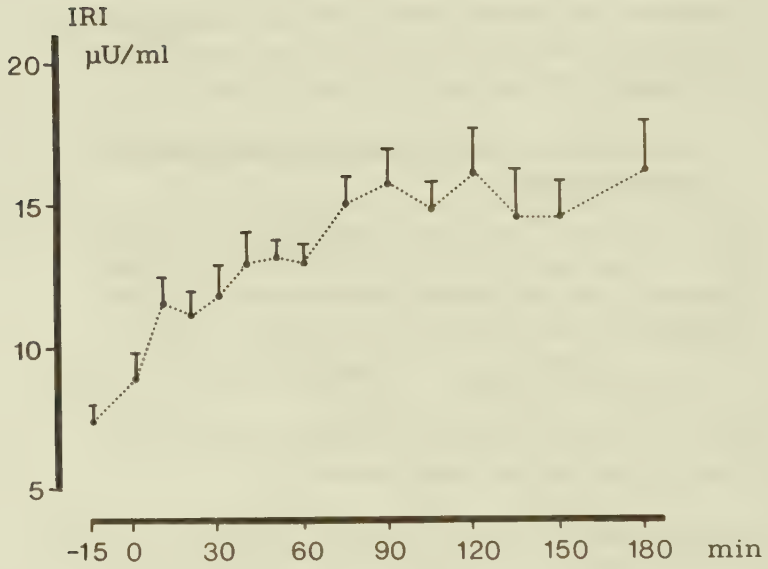

Abb. 4: Seruminsulin-Konzentrations-Zeitkurve nach subkutaner Injektion einer freien Mischung aus 6 E Actrapid^{R} und 14 E Monotard^{R} bei n = 5.

Die Berechnung der Fläche unter der Insulin-Konzentrations-Zeitkurve ergibt einen Wert von 1.166,05 ± 48,27 µU/ml x min.
Die Blutglukose fällt von einem Nüchternwert von 81 mg/dl auf einen Mindestwert von 56 mg/dl nach 120 Minuten (Abbildung 8) ab.

3.2 Velasulin^{R}/Insulatard^{R}

Die Konzentration des Seruminsulins steigt von einem Basiswert von 8,2 µU/ml ausgehend bis auf einen Maximalwert ($[IRI]_{max}$) von 21,4 ± 1,4 µU/ml. Dieser Wert läßt sich zum Zeitpunkt t = 52 ± 10 Minuten errechnen.

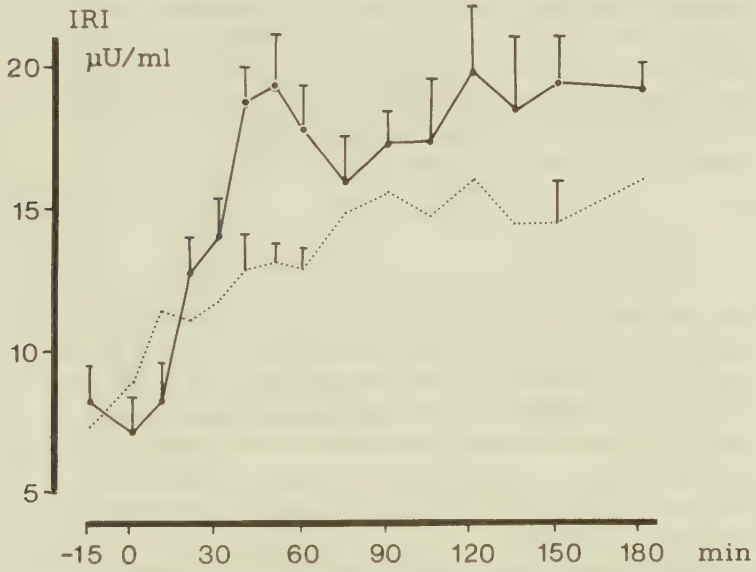

Abb. 5: Vergleich einer freien Mischung von Velasulin^{R} und Insulatard^{R} mit der Actrapid^{R}/Monotard^{R} Mischung. Dabei bedeuten a) ——— 6 E Velasulin^{R} + 14 E Insulatard^{R} (n=5) b) ···· 6 E Actrapid^{R} + 14 E Monotard^{R} (n=5). Mittelwerte ± SEM, bei ⊙ $p < 0,05$ Unterschied statistisch signifikant zur Actrapid^{R}/Monotard^{R} Gruppe.

Die Berechnung der Fläche unter der Seruminsulin-Konzentrations-Zeitkurve ergibt einen Wert von 1.350,3 ± 61,75 µU/ml min. Dieser Wert ist signifikant größer als im Actrapid^{R}/Monotard^{R} Versuch ($p < 0,025$).
Die Blutglukose sinkt von einem Ausgangswert von 85 mg/dl auf eine Konzentration von 56 mg/dl nach 105 Minuten ab (Abbildung 8).
In den ersten 30 Minuten zeigen die Insulinkonzentrations-Zeitkurven in beiden Versuchen einen ähnlichen Verlauf. Nach 40, 50, 60 und 150 Minuten ergeben sich jedoch gegenüber dem Actrapid^{R}/Monotard^{R} Versuch signifikant höhere Werte bei $p < 0,05$.
Die maximale Insulinkonzentration im Serum ($[IRI]_{max}$ = 21,38 ± 1,45 µU/ml) liegt gegenüber der Actrapid^{R}/Monotard^{R} Mischung (16,76 ± 1,21 µU/ml) nachweislich höher ($p < 0,025$) und wird signifikant früher erreicht ($p < 0,05$).
Die Blutglukose zeigt nach 60 Minuten einen signifikant niedrigeren Wert als im Actrapid^{R}/Monotard^{R} Versuch ($p < 0,05$)(Abbildung 8).

3.3 Mixtard^{R}

Das Seruminsulin steigt ausgehend von einem Nüchternwert von 8,6 µU/ml auf einen Maximalwert ($[IRI]_{max}$) von 16,3 ± 0,9 µU/ml. Dieser Wert wird nach 54 ± 11 Minuten ($T_{[IRI]_{max}}$) erreicht. Die Berechnung der Fläche unter der Seruminsulin-Konzentrations-Zeitkurve (AUC) ergibt einen Wert von 1.145,3 ± 45,5 µU/ml x min. Dieser Wert ist signifikant kleiner als im Velasulin^{R}/Insulatard^{R} Versuch ($p < 0,025$).
Die Blutglukose fällt von 82 mg/dl auf eine Konzentration von 59 mg/dl nach 150 Minuten ab (Abbildung 8).

Die Insulinkonzentrations-Zeitkurve zeigt einen ähnlichen Verlauf wie im Actrapid^{R}/Monotard^{R} Versuch. Auch hier ergeben sich gegenüber den Insulinkonzentrationen im Velasulin^{R}/Insulatard^{R} Versuch signifikant niedrigere Werte nach 40, 50 und 120 Minuten ($p < 0,05$). Die maximale Insulinkonzentration im Serum ($[IRI]_{max.}$ = 16,3 ± 0,9 µU/ml) liegt statistisch niedriger als im Velasulin^{R}/Insulatard^{R} Versuch (21,38 ± 1,45 µU/ml) ($p < 0,01$).

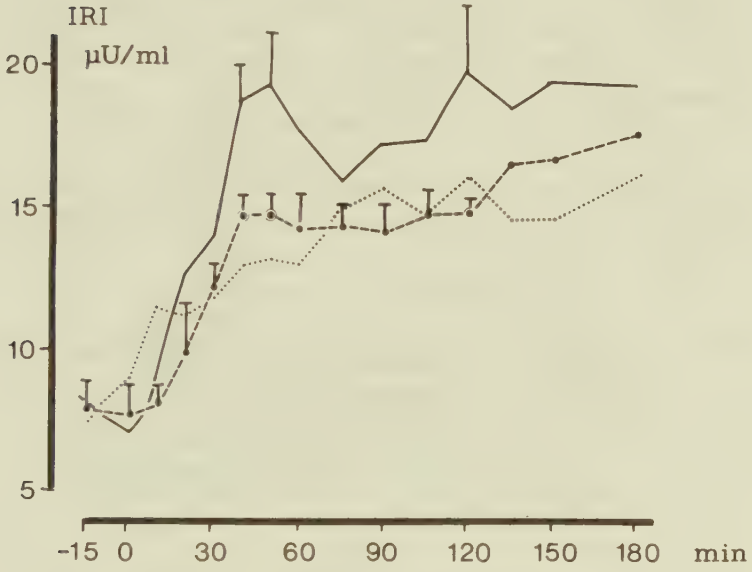

Abb. 6: Vergleich der kommerziellen Insulinmischung Mixtard^{R} mit zwei freien Insulinmischungen. Dabei bedeuten: a) ---- 20 E Mixtard^{R} (n=5) b) —— 6 E Velasulin^{R}+14 E Insulatard^{R} (n=5) c) .... 6 E Actrapid^{R} + 14 E Monotard^{R} (n=5). Bei ⊙ $p < 0,05$ signifikante Unterschiede gegenüber Velasulin^{R}/Insulatard^{R} im gepaarten Student-t-Test.

Für die Glukose ergeben sich gegenüber dem Actrapid^R/ Monotard^R nach 120 Minuten und gegenüber Velasulin^R/ Insulatard^R nach 105 Minuten signifikant höhere Konzentrationen ($p < 0,05$) (Abbildung 8).

Versuch	$[IRI]_{max}$ (µU/ml)	$T[IRI]_{max}$ (min)	AUC (0 - 90 Min.) µU/ml x min)
Actrapid^R/ Monotard^R n = 5	16,76 ± 1,21 xx	79 ± 7	1.166,05 ± 48,27 xx
Velasulin^R/ Insulatard^R n = 5	21,38 ± 1,45	52 ± 10 xxx	1.350,30 ± 61,75
Mixtard^R n = 5	16,26 ± 0,90 x	54 ± 11	1.145,30 ± 45,49 xx

Abb. 7: Maximale Seruminsulinkonzentrationen $[IRI]_{max}$, Zeitpunkt der maximalen Seruminsulinkonzentrationen $T[IRI]_{max}$ Flächen unter den Seruminsulinkonzentrationszeitkurven (AUC), Mittelwerte ± SEM. Dabei bedeuten: x signifikant gegen Velasulin^R/Insulatard^R bei $p < 0,01$; xx signifikant gegen Velasulin^R/Insulatard^R bei $p < 0,025$; xxx signifikant gegen Actrapid^R/ Monotard^R bei $p < 0,05$.

T	Actrapid^{R}/ Monotard^{R}	Velasulin^{R}/ Insulatard^{R}	Mixtard^{R}
min^{-1}		Glukose/mg/dl	
-15	81 ± 1	85 ± 3	82 ± 2
0	78 ± 2	83 ± 3	80 ± 2
10	79 ± 2	81 ± 3	80 ± 2
20	78 ± 2	82 ± 2	82 ± 2
30	76 ± 1	78 ± 2	80 ± 2
40	73 ± 2	72 ± 2	77 ± 2
50	72 ± 2	68 ± 3	74 ± 2
60	70 ± 2	x61 ± 4	68 ± 3
75	62 ± 2	59 ± 3	65 ± 3
90	60 ± 4	58 ± 3	63 ± 3
105	58 ± 4	xx56 ± 2	66 ± 3
120	56 ± 4	58 ± 2	x66 ± 4
135	58 ± 4	58 ± 2	63 ± 5
150	56 ± 3	56 ± 3	63 ± 3
180	57 ± 2	57 ± 2	59 ± 3

Abb. 8: Mittelwerte Glukose ± SEM. Dabei bedeuten: x signifikanter Unterschied gegenüber Actrapid^{R}/Monotard^{R} bei $p < 0,05$; xx signifikanter Unterschied gegenüber Mixtard^{R} bei $p < 0,05$.

4. Diskussion

In den letzten Jahren wurden mehrfach Arbeiten veröffentlicht, in denen die Behandlung von Patienten mit juvenilem Diabetes Mellitus mit freien Mischungen von Insulinen beschrieben wurde. So berichten Jovanovic (1980) und Tchoubrowsky (1980), daß sich durch diese Kombinationen optimale Stoffwechseleinstellungen erreichen lassen. Untersuchungen über die Absorptionskinetik liegen von diesen Autoren jedoch nicht vor. Harrower (1975) beobachtet bei der Kontrolle von Blutglukoseverläufen der von ihm behandelten Diabetiker, daß die Initialwirkung einer Mischung von Alt- und Protamin-Zinkinsulin nachließ, während die Depotwirkung verstärkt wurde. Er vermutete eine Konversion des Altinsulins in die Depotform durch die Anwesenheit von freien Zinkionen. Untersuchungen, die an Normalpersonen durchgeführt wurden, unterstützten diese Vermutung (Cüppers 1980). Bei diesen Versuchen wurde den Probanden eine Mischung von Actrapid^{R} und Monotard^{R} im Verhältnis 1: 1,6 einmal direkt nach dem Mischen und einmal 5 Minuten nach dem Mischen injiziert. Dabei zeigte sich, daß der Initialeffekt der Mischung nach der 5-minütigen Lagerung signifikant niedriger lag als bei sofortiger oder getrennter Injektion des Alt- und Verzögerungsinsulins.
Mit ähnlicher Fragestellung untersuchte Galloway (1981) Mischungen des Zinkinsulins Lente^{R} mit einem Altinsulin. Bei in vitro Untersuchungen fand er eine Konversion des Altinsulins in die Depotform bei Altinsulin/Lente^{R} Mischungen im Verhältnis 1:3 und 1:2 nach 15-minütiger Lagerung. Waren die Präparate im Verhältnis 1:1, 2:1 oder 3:1 gemischt, so zeigte sich kein signifikanter Übergang von Altinsulinmolekülen in Zinkinsulinkristalle. Seine Experimente lassen

sich jedoch nur bedingt mit den oben genannten Arbeiten vergleichen, da die Insuline Lente^{R} und Monotard^{R} zwar dieselbe Menge Zink enthalten, die Kristallstruktur der beiden Präparate möglicherweise jedoch differiert. Aus den bisher genannten Arbeiten geht eindeutig hervor, daß die wichtigsten Veränderungen bei freien Insulinmischungen den Anstieg der Absorption des Altinsulinanteils bis zum Absorptionsmaximum ($[IRI]_{max}$) betreffen. In unseren Versuchen zeigt sich in dieser Phase eine verminderte Resorption der Actrapid^{R}/Monotard^{R} Mischung (1:2,3) im Vergleich zur Velasulin^{R}/Insulatard^{R} Mischung (1:2,3). Der Vergleich mit den Versuchen von Cüppers, der nach sofortiger Injektion einer Actrapid^{R}/Monotard^{R} Mischung im Verhältnis 1:1,6 keine Veränderung der Absorptionskinetik feststellte, läßt vermuten, daß das Ausmaß und die Geschwindigkeit des Übergangs von Altinsulinmolekülen in die Depotform vom Mischungsverhältnis des Alt- und Zinkinsulins abhängig ist. Diese Vermutung deckt sich mit den Erkenntnissen Galloways (1981), der in seinen oben genannten Versuchen eine Korrelation zwischen der Größe des Zinkinsulinanteils und dem Übergang von Altinsulinmolekülen in Zinkinsulinkristalle feststellte. So ist anzunehmen, daß in unseren Versuchen möglicherweise schon während des Aufziehens und Mischens der beiden Insuline eine Konversion von Altinsulinmolekülen stattgefunden hat.

Die Absorptionskinetik einer freien Mischung von Velasulin^{R} und Insulatard^{R} wurde schon 1978 von Kølendorf untersucht. Als Parameter für die Insulinabsorption diente ihm die Messung der Blutzuckerwerte. Dabei stellte er keine Unterschiede zwischen einer freien Mischung von Velasulin^{R} und Insulatard^{R} und dem Insulin Mixtard^{R} fest. Dies entspricht auch unseren Ergebnissen in Bezug auf die blutzuckersenkende Wir-

kung einer Mischung von Velasulin^{R} und Insulatard^{R}. Die Auswertung der Blutzuckerwerte alleine bei Normalpersonen ist jedoch nicht hinreichend valide, die Absorptionskinetik eines Insulins ausreichend zu beschreiben. In unseren Versuchen zeigten sich bei der Velasulin^{R}/Insulatard^{R} Mischung während der Initialphase signifikant höhere Seruminsulinspiegel als bei dem Insulin Mixtard^{R}. Dies läßt vermuten, daß der Altinsulinanteil des Mixtard^{R} durch Übergang von Altinsulinmolekülen in die Depotform vermindert ist. Gestützt wird diese Vermutung durch in vitro Tests von Galloway (1981). Die beiden von ihm untersuchten kommerziellen Insulinmischungen (NPH Lilly^{R}, Mixtard^{R}) enthalten erheblich weniger Altinsulin als von den herstellenden Firmen angegeben wird. So beträgt der Anteil des kurzwirkenden Insulins im NPH Lilly^{R} (Protamin 0,4 mg/100 Units) statt 25 nur noch 3 bis 5 Prozent, und im Mixtard^{R} (Protamin 0,3 mg/100 Units) statt 30 nur noch 13 Prozent.

Die oben geäußerte Vermutung, daß ein Teil des Altinsulins in die Depotform übergeht, wird durch weitere Versuche Galloways untermauert. Galloway stellte durch in vitro Untersuchungen fest, daß in NPH/Altinsulinmischungen mit einem Protamingehalt zwischen 0,3 und 0,4 mg/100 Units der Anteil des kurzwirkenden Insulins relativ rasch abnimmt. Wird ein NPH-Insulin benutzt, dessen Protamingehalt 0,4 mg/100 Units beträgt, so ist der Verlust an kurzwirkendem Insulin schon nach 5-minütiger Lagerung signifikant. Durch Erhöhung des Altinsulinanteils in den Mischungen konnte der Verlust verringert werden. Dies läßt die Vermutung zu, daß die Abnahme des Anteils an kurzwirkendem Insulin auf einer Bindung der Altinsulinmoleküle durch Protamin beruhen könnte.

Bei der klinischen Untersuchung freier Insulinmischungen stellte Galloway fest, daß Präparate mit einem Protamingehalt von 0,4 mg/100 Units nach einer 15- bis 20-minütigen Lagerung deutliche Unterschiede in der Wirkung auf den Seruminsulinspiegel und den Abfall der Blutglukose im Vergleich zu einer direkt nach dem Mischen injizierten Präperation zeigten. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch gesichert. Bei Mischungen, die 0,3 mg Protamin/100 Units enthielten, wurden keine Unterschiede in der klinischen Wirkung registriert. Dies entspricht teilweise den von uns gemachten Beobachtungen. Das von uns verwendete Insulin Mixtard^{R} enthält 0,3 mg Protamin/100 Units. Die Auswertung der Seruminsulinspiegel bei dem Insulin Mixtard^{R} ergab - wie schon oben erwähnt - in der Initialphase statistisch gesicherte niedrigere Werte gegenüber einer freien Mischung von Velasulin^{R} und Insulatard^{R} (NPH). Dies steht nicht im Einklang mit den von Galloway gemachten Beobachtungen. Die Wirkung auf die Blutglukose war jedoch ebenso wie in Galloways Versuchen nicht signifikant verändert.

So läßt sich sagen, daß eine freie Mischung aus Velasulin^{R} und Insulatard^{R} bei erhöhten Seruminsulinspiegeln gegenüber einer freien Actrapid^{R}/Monotard^{R} Mischung und dem Insulin Mixtard^{R} keine Veränderung der klinischen Wirkung bei Normalpersonen zeigt.

5. Zusammenfassung

Bei der Untersuchung der Pharmakokinetik freier Mischungen von Insulinen im Vergleich zu einer kommerziellen Mischung zeigt sich, daß der Initialeffekt der freien Mischung von Velasulin^{R} und Insulatard^{R} signifikant stärker ausgeprägt ist, als bei der kommerziellen Mischung Mixtard^{R}. Die verstärkte Wirkung des Altinsulinanteils zeigt sich auch gegenüber der Mischung Actrapid^{R}/Monotard^{R}. Zwischen der Mischung Actrapid^{R}/Monotard^{R} und dem Insulin Mixtard^{R} läßt sich keine unterschiedliche Absorptionskinetik nachweisen. Beim Gebrauch einer freien Mischung von Velasulin^{R} und Insulatard^{R} kann in der Initialphase mit höheren Seruminsulinkonzentrationen gerechnet werden als bei Anwendung einer freien Mischung von Actrapid^{R} und Monotard^{R} oder der kommerziellen Mischung Mixtard^{R}. Eine verstärkende hypoglykämische Wirkung der Velasulin^{R}/Insulatard^{R} Mischung gegenüber dem Mixtard^{R} oder der Actrapid^{R}/Monotard^{R} Mischung konnte in diesen Versuchen bei Normalpersonen statistisch nicht nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

Banting, F.G.:
Best, C.H.
Pancratic extracts in the treatment of diabetes mellitus.
Canad. med. Ass. J. 12. 141-144 (1922)

Berger, M:
Halban, P.A.
Müller, W.A.
Offord, R.E.
Renold, A.E.
Vranic, M.
Mobilization of subcutaneously injected tritiated insulin in rats: effects of muscular exercise.
Diabetologia 15: 133-140 (1978)

Berger, M.:
Halban, P.A.
Girardier, L.
Seydoux, J.
Offord, R.E.
Renold, A.E.
Absorption kinetics of subcutaneously injected insulin. Evidence for degradation at the injection site.
Diabetologia 7: 97-99 (1979)

Berger, M.
Cüppers, H.J.
Hegner, H.
Jörgens, V.
Berchthold, P.
Absorption kinetics and biologic effects of subcutaneously injected insulin preparations
Diabetes Care 5: 2, 77-91 (1982)

Brownlee, M.:
Cahill, G.F.
Diabetic control and vascular complicationes.
Atherosclerosis Reviews 4: 29-70 (1979)

Buddecke, E.:
Grundriss der Biochemie.
Walter de Gruyter Verl., Berlin New York (1977)

Cüppers, H.-J.: Pharmakokinetik subkutan injizierten Insulins, klinisch experimentelle Untersuchungen zur Insulin-Absorption. Habilitationsschrift der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf (1980)

Galloway, J.A.: Spradlin, C.T. Jackson, R.L. Otto, D.C. Bechtel, L.D. Mixtures of intermediate acting (NPH and Lente) with regular insulin. Personality communications (Key Biscayne, Florida 1981)

Galloway, J.A.: Spradlin, C.T. Nelson, R.L. Wentworth, S.M. Davidson, J.A. Swarner, J.L. Factors influencing the absorption, seruminsulin concentration and blood glucose responses after injections of regular insulin and various insulin mixtures. Diabetes Care, Vol. 4, No. 3, 366-376 (May-June 1981)

Galloway, J.A.: Spradlin, C.T. Root, M.A. Fineberg, S.E. The plasma glucose response of normal fasting subjects to neutral regular and NPH biosynthetic human and purified pork insulins. Diabetes Care, Vol. 4, No. 2, 183-188 (March-April 1981)

Hagedorn, H.C.: Fortschritte in der Insulintherapie. Schw. Med. Wschr. 68, Nr. 2, 37-41 (1938)

Hallas-Møller, K.: Petersen, K. Schlichtkrull, J. Crystalline and amorphous insulin-zinc compounds with prolonged action. Ugeskr. Laeg. 113: 1761 (1951)

Harrower, A.D.B.:
Duncan, L.J.P.
Clarce, B.F.
Comparison of injection techniques for soluble and protamine zinc insulins in diabetes mellitus. The Practitioner 214: 228-231 (1975)

Jörgens, V.:
Berchtold, P.
Berger, M.
Therapie des insulinbedürftigen Diabetes Mellitus: regelmäßige Stoffwechselselbstkontrolle und Insulindosisadaptation durch den Patienten. Dtsch. Med. Wschr. 104: 1796-1798 (1979)

Jovanovic, L.:
Petersen, C.M.
Saxena, B.B.
Dawood, Y.
Saudek, C.D.
Feasibility of maintaining normal glucose profiles in insulin-dependent pregnant diabetic woman. Am. J. Medicine 68: 105-112 (1980)

Kasemir, H.D.:
Kerp, L.
Insulinbehandlung des Diabetes Mellitus.
Pharmakotherapie, 3, Nr. 5
228-232 (1980)

Klotz, U.:
Klinische Pharmakokinetik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York (1979)

Kølendorf, K.:
Aaby, P.
Westergaard, S.
Deckert, T.
Absorption, effectiveness and side effects of highly purified porcine NPH-Insulin preparationes (Leo^{R}).
Europ. J. Clin. Pharmacol. 14, 117-124 (1978)

Luft, R.: Insulin: Islet pathology-islet function-insulin treatment. Ed. R. Luft, Verl.: Lindgren und Söner AB, Mölndal, Schweden (1976)

Schlichtkrull, J.: Pingel, M. Heding, L.G. Brange, J. Jorgensen, K.H. Insulin preperations with prolonged effect. In: Insulin, Part 2, Handbook of experimental pharmacology. Hasselblatt, A., Bruchhausen, F. von (Eds.), 729-777 Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1975

Schöffling, K.: Müller, R. Die klinische Wirkung der Insulinzubereitungen. In: Insulin, Part 1, Handbook of experimental pharmacology. Dörzbach, E. (Ed.) 321-338, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1971

Spitza, H.: Vogel, G. Untersuchungen zur Pharmakokinetik subkutan injizierten Alt-Insulins. Dissertation der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf (1981)

Steno study group: Effect of 6 months of strict metabolic control on eye and kidney function in insulin-dependent Diabetics with background retinopathy. Lancet, 16. June 121-123 (1982)

Tchoubroutsky, G.: Charitanski, D. Blouquit, Y. Papoz, L., Soria, J., Rosa, J. Diabetic control in 102 insulin-treated out-patients. Diabetologia 18: 447-452 (1980)

Wide, L.:
Porath, F.

Radioimmunassay of proteins with the use of sephadex-coupled antibodies.
Biochem. Biophys. Acta 130, 257 (1966)

Lebenslauf

Ich wurde am 23. August 1958 als Sohn des Kaufmannes Bernhard Caspari und seiner Frau Emma Caspari geb. Speitkamp in Düsseldorf geboren.
Von 1965 bis 1968 besuchte ich eine katholische Volksschule und von 1968 bis 1977 das mathematisch-naturwissenschaftliche Lessing-Gymnasium. 1977 legte ich dort meine Reifeprüfung ab.
Seit dem Sommersemester 1978 studiere ich in Düsseldorf Medizin. Ich bestand im Frühjahr 1980 die ärztliche Vorprüfung und im März 1981 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
Ich beabsichtige, 1983 den zweiten und 1984 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung zu absolvieren.